

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВАТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ – ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО УСТРОЙСТВА

**Д.А. Макаревич¹, Е.М. Ермола¹, Т.В. Рябцева²,
Е.Л. Седёлкина², В.В. Кирковский²**

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Олигопептиды как сигнальные молекулы в норме представляют собой цитокины и гормоны. Преимущество олигопептидных молекул для активации фагоцитарных клеток в строгой специфичности к рецепторам поверхности клеток. Пептиды, например аналоги или производные цитокинов используются для парентерального введения.

В патентных базах можно найти описание пептидов природного и синтетического происхождения стимулирующих миграцию нейтрофилов и влияющих на другие клетки иммунной системы, которые можно применять как для внутримышечного так и для внутривенного введения. В литературе описаны активаторы зимозан, гликопротеид клеточной стенки дрожжей, формилированные пептиды [1].

Однако существующие иммуномодулирующие вещества, избирательно активирующие неспецифическое звено иммунитета – клетки нейтрофилы обладают критическими недостатками: зимозан – плохо растворим в воде, экстракты бактериальных клеток и дрожжей обладают высокой иммуногенностью, поэтому поиск универсального лиганда для строгой активации нейтрофилов крови актуален.

Целью нашей работы была оценка активирующих свойств клеточных активаторов различной природы.

На сегодняшний день в медицине разрешены к применению синтетические пептиды (Ронколейкин, Лейкомакс, Нейтростим и др.). Формилированные пептиды являются продуктами деградации бактериальных белков и активаторами клеток неспецифического иммунитета [2]. При взаимодействии с вышеуказанными пептидами происходит дегрануляция и активация свободно-радикальных реакций фагоцитами.

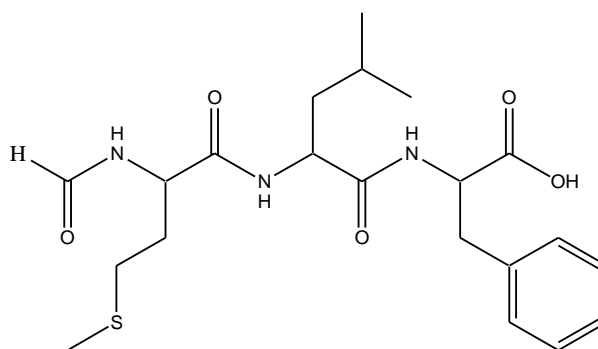


Рисунок 1. – N-формил-L-метионил-L-лейцин-L-фенилаланин

В литературе описан прямой контакт формильной группы метионина с FPR1 рецептором нейтрофилов для подачи активирующего сигнала фагоциту, формильная группа не должна быть конформационно закрыта на поверхности разрабатываемого иммуномодулятора.

N-формил-L-метионил-L-лейцин-L-фенилаланин (FMLP) – является сильнейшим хемоаттрактантом и активирует рецептор FPR1 на поверхности нейтрофилов однако в силу структурных особенностей данный дипептид не представляется возможным иммобилизовать на полимерном носителе, ввиду отсутствия в его составе аминокислоты, которая используется для прикрепления к матрице, поэтому одной из задач нашего исследования было спрогнозировать соединения обладающие сходной активностью и возможностью иммобилизации без изменения активных групп, участвующих в активации клеток крови.

Для успешной иммобилизации формилированных пептидов в лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии была проведена модификация формилированного олигопептида.

Для реализации задачи было решено произвести синтез формилированного пептида, заменив аминокислоту лейцин(2) (Leu) на лизин (2) (Lys). Лизин имеет 2 аминокислотные группы. Одну аминокислотную группу планируется использовать для синтеза пептида, другая будет использована для введения в объем полиакриламидного гидрогеля. Таким образом, было принято решение оценить эффективность активации нейтрофилов при взаимодействии со следующим олигопептидом: N-формил-метионил-L-лизил-L-фенилаланин;

Активирующее действие пептидов в растворе и активность иммуномодулятора в отношении фагоцитов может отличаться, ввиду того, что у пептидов в растворе будет присутствовать свободная аминокислотная группа. В качестве сравнения были взяты зимозан (Sigma) и выделенный гликопротеин клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae* (патент РБ №20160082).

Исследование биологических эффектов фракции гликопротеинов клеточной стенки дрожжей, зимозана и модифицированных формилированных олигопептидов проводились на цельной гепаринизированной крови практически здоровых доноров, а также пациентов с рецидивирующими формами хронической гнойной патологии на базе лаборатории гемологии и лимфосорбции НИЧ БГМУ на базе 9-ой клинической больницы г. Минска.

Синтез пептида осуществлялся на базе лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси. Синтез трипептида N-формил-метионил-L-лизил-L-фенилаланин осуществляли в 4 этапа (Рисунок 2):

а) Синтез Boc-Lys(z)-Phe

В круглодонной колбе растворяли, перемешивая на магнитной мешалке, N_α-трет-бутилоксикарбонил-лизин (карбобензоксипептид) в диоксане и прибавляли N-гидроксисукцинимид. Охлаждали с помощью ледяной бани до минус 5 °С и при перемешивании добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 2,5 ч. Выпавший осадок N,N'-диизопропилмочевины от-

фильтровывали на фильтре Шотта с колбой Бунзена, промывали небольшим количеством диоксана. Фильтрат, представляющий собой диоксановый раствор сукцинимидного эфира N_{α} -трет-бутилоксикарбонил-лизина (карбобензокси) использовали на следующей стадии. В круглодонной колбе растворяли фенилаланин и гидрокарбонат калия в воде. К полученному раствору при постоянном перемешивании добавляли диоксановый раствор сукцинимидного эфира N_{α} -трет-бутилоксикарбонил-лизина(карбобензокси). Перемешивание продолжали при температуре 8-10 °С в течение 3 часов, после чего упаривали диоксан с помощью вакуум-роторного испарителя. После чего проводили переосаждение из этилацетата петролейным эфиром и сушили в вакуум-эксикаторе при остаточном давлении 10-20 мм рт. ст. до постоянной массы.

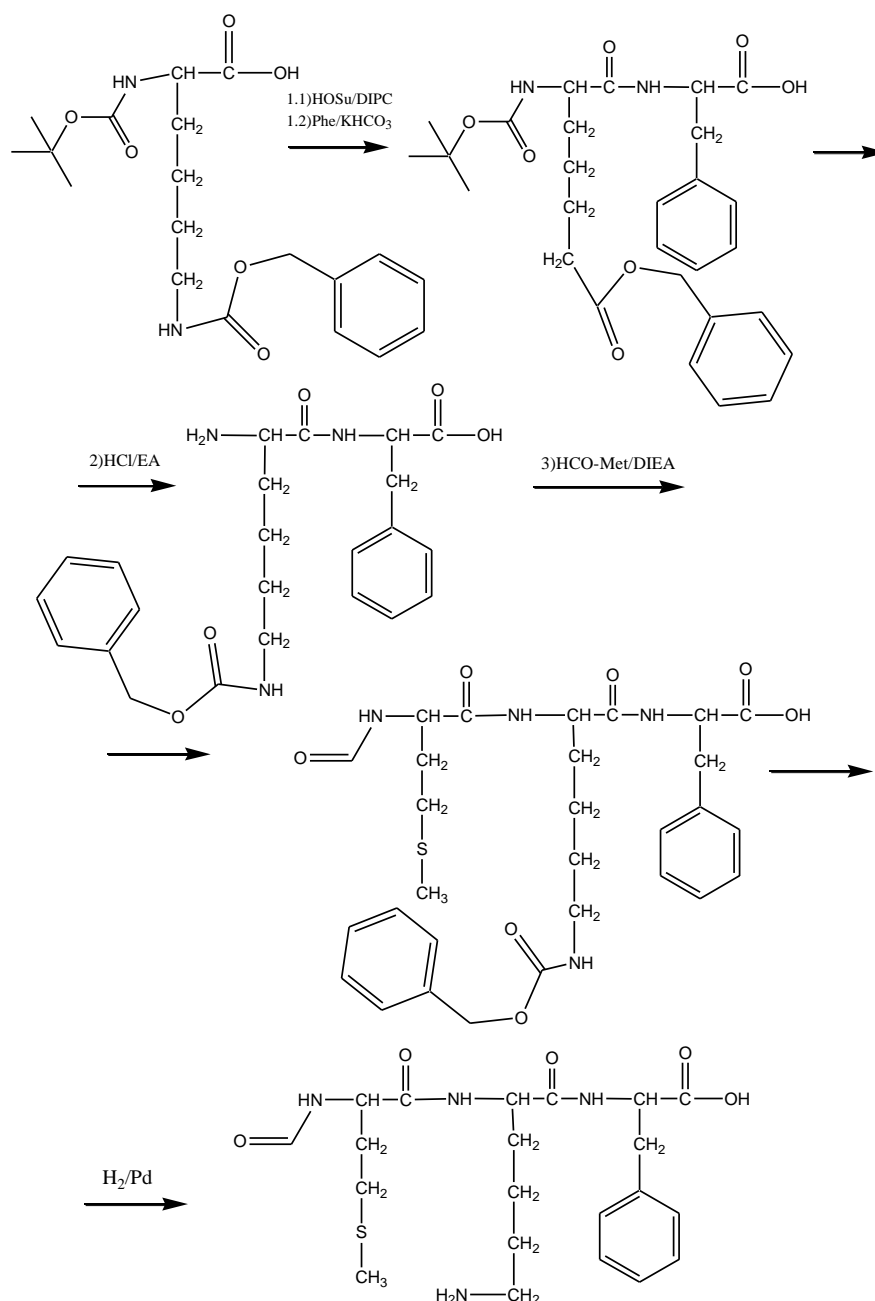


Рисунок 2. – Схема химического синтеза олигопептида HCO-Met-Lys(z)-Phe

б) Синтез Lys(z)-Phe·HCl

В круглодонную колбу помещали N_{α} -трет-бутилоксикарбонил-лизин(карбобензокси)-фенилаланин и добавляли 4-5 М раствор хлористоводородной кис-

лоты в этилацетате, после чего активно перемешивали на шейкере около 1,0 ч. После упаривания этилацетата с помощью вакуум-роторного испарителя осадок промывали диэтиловым эфиром и сушили в вакуум-эксикаторе при остаточном давлении 10-20 мм рт. ст. до постоянной массы.

в) Синтез HCO-Met-Lys(z)-Phe

В круглодонной колбе растворяли, перемешивая на магнитной мешалке, формил-метионин в диоксане и прибавляли N-гидроксисукцинимид. Охлаждали с помощью ледяной бани до минус 5 °С и при перемешивании добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 2,5 ч. Выпавший осадок N,N'-диизопропилмочевины отфильтровывали на фильтре Шотта с колбой Бунзена, промывали небольшим количеством диоксана. Фильтрат, представляющий собой диоксановый раствор сукцинимидного эфира формил-метионина использовали на следующей стадии.

В круглодонной колбе растворяли лизил (карбобензоксид)-фенилаланина гидрохлорид в диметилформамиде и добавляли диизопропилэтиламин. К полученному раствору при постоянном перемешивании добавляли диоксановый раствор сукцинимидного эфира формил-метионина. Перемешивание продолжали при температуре 8-10 °С в течение 4 часов, после чего разбавляли реакционную смесь этилацетатом и промывали последовательно 10% лимонной кислотой, дистиллированной водой. Сушили сульфатом натрия и упаривали этилацетат с помощью вакуум-роторного испарителя. Проводили переосаждение и сушили в вакуум-эксикаторе при остаточном давлении 10-20 мм рт. ст. до постоянной массы.

в) Гидрирование HCO-Met-Lys(z)-Phe

В двухгорлой колбе растворяли формил-метионил-лизил (карбобензоксид)-фенилаланин в смеси уксусной кислоты и метанола в соотношении 1:4 при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке.

Добавляли Pd-катализатор и пропускали водород через реакционную смесь. После окончания реакции отфильтровывали палладий на фильтре Шотта с колбой Бунзена. После упаривания с помощью вакуум-роторного испарителя осадок промывали диэтиловым эфиром и сушили в вакуум-эксикаторе при остаточном давлении 10-20 мм рт. ст. до постоянной массы.

Выход полученного трипептида N-формил-L-метионил-L-лизил-L-фенилаланин равен 87,1% и его масса составила 39 мг.

Результаты биологических экспериментов показали (таблица), что гликопротеин и зимозан, в отличие от формилированного олигопептида, обладает большей иммуностимулирующей активностью в отношении лейкоцитов, что выражалось увеличением синтетической функции клеток (производство цитокинов). Что касается формилированного олигопептида, то его влияние на активацию нейтрофилов после контакта с цельной кровью остается неясным. Имеется тенденция к повышению концентрации цитокинов, однако значения не являются достоверными. Нами было выдвинуто предположение о деградации олигопептида ферментами цельной крови.

Интерпретируя факт нарастания концентрации цитокинов после контакта с клетками крови можно отметить, что полученный нами из клеточного лизата дрожжей гликопротеин обладает схожей с известным клеточным активатором Зимозаном активностью. Однако выделенная нами форма гликопротеина, в отличие от зимозана является хорошо растворимой и может быть иммобилизована на гемосовместимую матрицу с целью синтеза иммуномодуля.

Таблица – Концентрация интерлейкина-6, интерлейкина-8 и миелопероксидазы (нг/мл) в надосадочной жидкости после воздействия на цельную кровь гликопротеина, зимозана и олигопептида

Наименование	Интерлейкин-6 (пг/мл)	Интерлейкин-8 (пг/мл)	Фактор некроза опухоли- альфа (пг/мл)
Гликопротеин	421,15* (295,34;602,85)	462,30* (358,29;512,55)	586,59* (411,18;582,36)
Зимозан	378,06* (329,18;592,12)	361,04* (326,85;406,25)	158,27 (125,39;178,01)
Физ. р-р	4,23 (0,00;12,87)	6,32 (1,32;9,24)	15,46 (5,39;36,99)
Олигопептид f-Met-Lys-Phe	27,56 (3,09;42,71)	37,68 (15,02;63,21)	64,30 (0,00;16,88)

*– результаты достоверны в сравнении с контролем (критерий -Манн-Уитни)

Полученные на данном этапе результаты исследований свидетельствуют об отсутствии достоверных изменений в концентрации цитокинов после воздействия синтетического олигопептида (N-формил-L-метионил-L-лизил-L-фенилаланин) на клетки крови. Возможно, сериновые протеазы крови разрушают олигопептид, препятствуя осуществлению активационного сигнала. Следовательно, необходимо провести дополнительную модификацию олигопептида с целью защиты соединения от воздействия протеолитических ферментов.

Таким образом, выделенный из клеточной стенки дрожжей гликопротеин, может быть рекомендован в качестве лиганда для иммуномодуля, который в дальнейшем можно будет использовать у пациентов с хроническими гнойными инфекциями для активации клеточного иммунитета и подавления микроорганизмов в очаге инфекции.

Список использованных источников

1. Новиков Д. К. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммунореабилитация / Новиков Д. К., Новиков П. Д., Титова Н. Д. – 2006, 198 с.
2. Showell H.J. \\The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils\\ H.J. Showell, M.A. Panaro et al. \\Cellular responses to FMLP challenging: a mini-review\\Immunopharmacology and Immunotoxicology 1999, 143(5), 1154-1166.